

Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Zvonimir Perković

Potenciometrijska karakterizacija nanosuspenzije  
indometacina

(Potentiometric characterization of indomethacin  
nanosuspension)

Završni rad

Mentor:

doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Osijek, 2019.

## **Sažetak:**

Indometacin je lijek koji posjeduje protuupalna, analgetska i antipiretska svojstva. Spada u skupinu nesteroidnih protuupalnih analgetika (NSAID). Farmakološki učinak indometacina je neselektivna inhibicija enzima ciklooksigenaze. Glavni tehnološki problem kod indometacina, kao i kod svih lijekova koji spadaju u BCS-II skupinu je slaba topljivost u vodi. Kako bi se poboljšala topljivost lijekova u vodi razvijene su mnoge farmaceutsko-tehnološke strategije izrade prikladnih ljekovitih oblika (kruta disperzija, emulzija, mikrokapsuliranje, itd.). Jedna od tih strategija je priprema nanokristala te izrada nanosuspenzija. U ovom radu provedena je priprema i pokušaj karakterizacije nanosuspenzije indometacina. Metode kojima se izvršila karakterizacija su: DLS, TEM i potenciometrijska titracija nanosuspenzije, s naglaskom na zadnju metodu. Prvi rezultati pokazali su očitu razliku između titracijskih krivulja, ali izračun površinskog suviška protona se nije mogao napraviti zbog neodvoljne koncentracije krute tvari i upitnog stanja pH elektrode koja je korištena pri potenciometrijskim titracijama.

## **Ključne riječi:**

Potenciometrijska titracija, nanočestice, nanosuspenzija, indometacin

**Abstract:**

Indomethacin is a drug with anti-inflammatory, analgetic and anti-pyretic properties. Indomethacin is classified as non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID). Pharmacological effect of indomethacin is non-selective inhibition of cyclooxygenase enzyme. Main technological problem with indomethacin, as well as with all drugs from BCS-II Class is poor solubility in water. Many pharmaceutically-technological strategies have been developed in order to improve properties of drug solubility in water (solid dispersions, emulsions, microcapsules). In this paper, the preparation and attempt to characterize indomethacin nanosuspension was performed. Methods by which the characterization was performed were: DLS, TEM and potentiometric titration of nanosuspension, with an emphasis on the latter. The first results showed obvious difference between titration curves, but calculation of surface proton excess could not be made due to insufficient concentration of the solid and questionable state of pH electrode that was used in the potentiometric titrations.

**Key words:**

Potentiometric titration, nanoparticles, nanosuspension, indomethacin

## Sadržaj:

1. Uvod .....	1
2. Glavni dio .....	2
2.1. BCS – sustav klasifikacije biofarmaceutika .....	2
2.1.1. Topljivost.....	2
2.1.2. Permeabilnost.....	4
2.2. Indometacin .....	5
2.2.1. Farmakodinamika indometacina .....	6
2.2.2. Mehanizam djelovanja .....	6
2.2.3. Farmakokinetika indometacina .....	7
2.2.4. Nuspojave korištenja indometacina .....	7
2.2.5. Farmaceutsko-tehnološki aspekti .....	8
2.3. Potenciometrijska titracija .....	10
2.3.1. Mjerenje površinskog naboja potenciometrijskom titracijom .....	13
3. Eksperimentalni dio:.....	16
3.1. Priprava nanosuspenzije indometacina.....	16
3.2. Karakterizacija nanosuspenzije.....	16
3.2.1. Određivanje Zeta-potencijala mjerenjem elektroforetičke mobilnosti .....	16
3.2.2. Dinamičko raspršivanje svjetlosti (Dynamic Light Scattering, DLS) za određivanje raspodjele veličine kristala indometacina .....	17
3.2.3. Transmisijska elektronska mikroskopija (Transmission Electron Microscopy - TEM) .....	17
3.2.4. Potenciometrijska karakterizacija nanosuspenzije .....	17
4. Rezultati i rasprava .....	19
4.1. Priprava nanosuspenzije indometacina.....	19
4.2. Karakterizacija nanosuspenzije.....	19
4.2.1. Određivanje zeta potencijal mjerenjem elektroforetičke mobilnosti:.....	19
4.2.2. Dinamičko raspršivanje svjetlosti (Dynamic Light Scatering DLS) za određivanje raspodjele veličine kristala indometacina .....	20
4.2.3. ....	21

TEM Transmisijnska elektronska mikroskopija (Transmission Electron Microscopy TEM) .....	21
4.2.4. Potenciometrijska karakterizacija nanosuspenzije .....	22
5. Zaključak .....	24
6. Literatura .....	25

## 1. Uvod

Sinteza novih lijekova je poprilično složen proces. Zahtijeva udruživanje znanja stručnjaka iz raznih područja znanosti (kemije, medicine, farmacije...). Proces sinteze novog lijeka je jako spor i skup. Od početne molekule koja ima potencijal za uporabu u liječenju pa sve do gotovog farmaceutskog pripravka može proći preko deset godina istraživanja. Istraživanje se provodi na razne načine: analiza strukture spojeva, analiza stabilnosti spojeva u različitim uvjetima, in vitro i in vivo testovi, određivanje najprikladnijeg ljekovitog oblika (tableta, kapsula, suspenzija, gel...), sve do kliničkih ispitivanja. Najveći problem kod sinteze novih lijekova je njihova slaba topljivost u vodi, zbog čega čak 30% novih lijekova ne dolazi na tržište. Jedan od načina poboljšavanja topljivosti u vodi i na taj način poboljšanja bioraspoloživosti je proizvodnja nanokristala farmaceutski aktivne tvari. Pojavom nanotehnologije s vremenom se pronšla potencijalna primjena nanomaterijala i nanočestica u medicini. Danas se osim sinteze novih lijekova provode i mnoga ispitivanja na već postojećim lijekovima uz primjenu nekog oblika nanotehnologije. Cilj ovog rada je procesom potenciometrijske titracije okarakterizirati novi potencijalni ljekoviti oblik, tj. nanosuspenziju, za nesteroidni protuupalni analgetik indometacin.

## 2. Glavni dio

### 2.1. BCS – sustav klasifikacije biofarmaceutika

BCS (Biopharmaceutics classification system) je sustav koji klasificira tvari (bioaktivne tvari, lijekove) u određene kategorije. Postoje četiri moguće kategorije i dva kriterija pomoću kojih se određuje u koju kategoriju spada pojedina tvar. Prvi kriterij je topljivost, a drugi permeabilnost odnosno propusnost.

Tablica 1. BCS sustav klasifikacije biofarmaceutika[1].

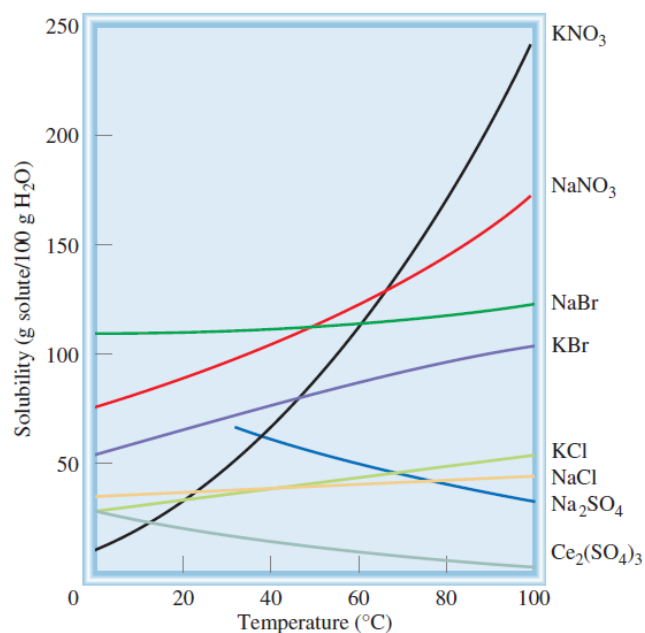
KLASA	KRITERIJI
Klasa 1	Visoka topljivost, visoka permeabilnost: generalno vrlo dobro apsorbirajuće tvari.
Klasa 2	Niska topljivost, visoka permeabilnost: tvari pokazuju apsorpciju ograničenu brzinom otapanja.
Klasa 3	Visoka topljivost, niska permeabilnost: tvari pokazuju apsorpciju ograničenu permeabilnošću.
Klasa 4	Niska topljivost, niska permeabilnost: vrlo slaba oralna bioraspoloživost.

#### 2.1.1. Topljivost

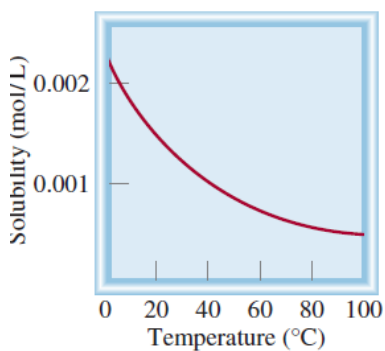
Topljivost je svojstvo krute, tekuće ili plinovite tvari da se otapa u krutom, tekućem ili plinovitom otapalu formirajući homogenu otopinu. Topljivost određene tvari prvenstveno ovisi o vrsti korištenog otapala, a veliku ulogu u povećanju ili smanjenju topljivosti imaju temperatura i tlak. Stupanj topljivosti određene tvari u specifičnom otapalu mjeri se i definira kao najveća količina neke tvari koja se može otopiti u navedenom otapalu pri danoj temperaturi i tlaku, gdje se daljnjim dodavanjem otopljene tvari u otapalo neće povećavati koncentracija otopine [2].

Otapalo je u većini slučajeva tekućina, koja može biti čista tvar ili smjesa dviju različitih tekućina. Stupanj topljivosti proteže se od „beskonačne topljivosti“ ili potpunog miješanja - kao što su voda i etanol, sve do slabe topljivosti – standardni primjer je srebrov klorid i voda [2].

Sadržaj, tj. koncentracija otopine izražava se na različite načine, a neki od njih su: maseni udio, molarni udio, masena koncentracija, molarna koncentracija i molalnost. Povećanjem temperature dolazi do povećanja topljivosti krutih tvari i smanjenja topljivosti plinova u tekućem otapalu.



Slika 1. Ovisnost topljivosti krutina u tekućinama o temperaturi[3].



Slika 2. Ovisnost topljivosti plinova (O<sub>2</sub>(g)), u tekućinama o temperaturi [3].



Tablica 2. Kriterij topljivosti prema USP (United States Pharmacopoeia)[1].

Topljivost	Dio otapala po dijelu otopljene tvari (mL otapala po g otopljene tvari)
Vrlo dobro topljivo	Manje od 1
Dobro topljivo	Od 1 do 10
Topljivo	Od 10 do 30
Slabije topljivo	Od 30 do 100
Slabo topljivo	Od 100 do 1000
Vrlo slabo topljivo	Od 1000 do 10000
Praktički netopljivo	10000 i više

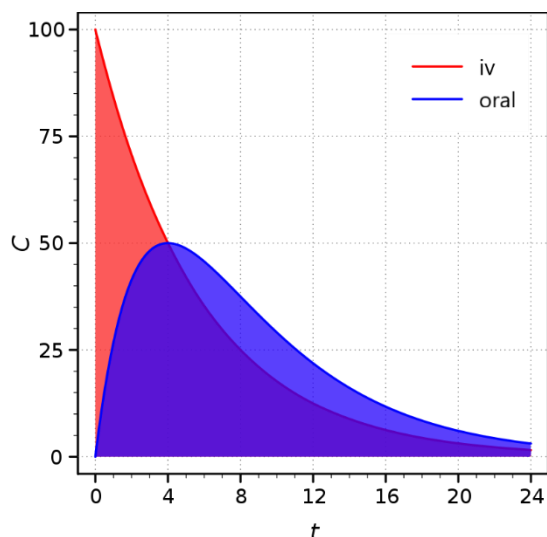
### 2.1.2. Permeabilnost

Permeabilnost, tj. propusnost (lat. permeare) je prolazak ili difuzija plina, tekućine ili krutine kroz određeni materijal ne stvarajući pri tome nikakve kemijske i/ili fizikalne promjene na tom materijalu [4]. Određivanje permeabilnosti aktivne tvari temelji se na izračunavanju apsolutne bioraspoloživosti [5]. Bioraspoloživost je farmakokinetičko svojstvo tvari koje se definira kao brzina apsorpcije i količina aktivne tvari iz primijenjene doze koja se apsorbira iz ljekovitog oblika te u nepromijenjenom stanju krvotokom dolazi do aktivnog mjesta. Kod intravenozne primjene tvari bioraspoloživost iznosi 100%. Bioraspoloživost oralno primijenjene aktivne tvari može se dobiti usporedbama površina ispod krivulje intravenozno i oralno primijenjene aktivne tvari na sljedeći način [6]:

$$(1) F = \frac{AUC_{oral}}{AUC_{iv}} \times \frac{Dose_{iv}}{Dose_{oral}}$$

**F** – bioraspoloživost; **AUC<sub>oral</sub>** – površina ispod krivulje (kod oralne primjene); **AUC<sub>iv</sub>** – površina ispod krivulje (kod intravenozne primjene); **Dose<sub>oral</sub>** – Primijenjena doza (oralno); **Dose<sub>iv</sub>** – primijenjena doza (intravenozno).

Tvar ima visoku permeabilnost ako bioraspoloživost kod oralne primjene iznosi 85% ili više.

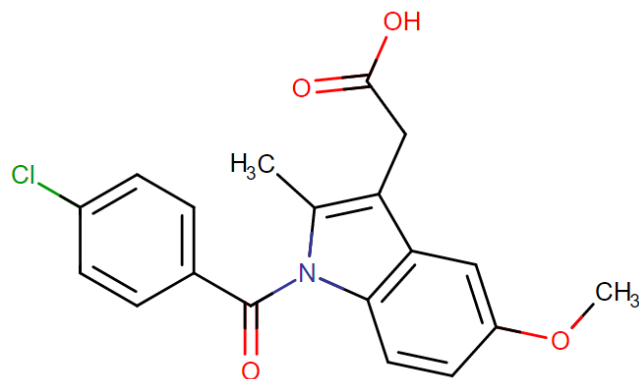


Slika 3. Usporedba  $AUC_{iv}$  i  $AUC_{oral}$  ( $AUC$  – Area Under the Curve);  $C$  – koncentracija tvari u krvnoj plazmi;  $t$  – vrijeme [7].

## 2.2. Indometacin

Indometacin je lijek koji ima protuupalna, analgetska i antipiretska svojstva, a spada u skupinu nesteroidnih protuupalnih analgetika (NSAID). NSAID skupina sastoji se od članova koji nemaju strukturnu povezanost, tj. sličnost određenu reaktivnom skupinom. Sastoje od više različitih reaktivnih skupina i postoje u nekoliko kategorija. Indometacin spada u derivate indol-octene kiseline. IUPAC nomenklatura indometacina je 2-[1-(4-klorobenzoil)-5-metoksi-2-metil-1H-indol-3-il] octena kiselina. Molekulska formula indometacina je  $C_{19}H_{16}ClNO_4$ . Molarna masa molekule iznosi 357,788 g/mol. Indometacin je otkriven 1963., zajedno sa još nekoliko derivata octene kiseline kao što je diklofenak. Farmakološki učinak indometacina je neselektivna inhibicija enzima ciklooksigenaze (COX), glavnog enzima odgovornog za katalizu biosintetskog puta prostaglandina i tromboksana preko arahidonske kiseline [8].

Indometacin se primijenjuje oralno kod odraslih i djece starije od 14 godina u liječenju simptoma: upalnih reumatskih bolesti, pogotovo kada su ostali NSAID neučinkoviti; reumatoidni artritis, degenerativne bolesti zglobova kao osteoartritis; akutni urički artritis (giht); izvanzglobni reumatizam; bolna stanja nakon kirurških i zubarskih zahvata, itd. [9].



Slika 4. Strukturna formula indometacina [8].

### 2.2.1. Farmakodinamika indometacina

Indometacin je NSAID sa analgetskim i antipiretskim svojstvima koji svoje djelovanje usmjerava na način da inhibira sintezu faktora koji utječu na stvaranje upale, temperature i boli. Terapeutsko djelovanje indometacina ne uključuje hipofizno-adrenalnu stimulaciju. Glavni način djelovanja je smanjivanje upale kod reumatoidnog artritisa. Efektivnost protuupalnog djelovanja ispoljava se u obliku smanjenja natečenosti i jutarnje ukočenosti zglobova. Dolazi do povećanja mobilnosti zglobova. S druge strane, korištenje indometacina povezano je sa rizikom pojave ozbiljnih kardiovaskularnih tromboičnih stanja, uključujući infarkt miokarda. Također, moguće su i pojave gastrointestinalnih komplikacija kao što su: krvarenje, ulceracija, perforacija stomaka i crijeva [8]. U usporedbi sa ostalim NSAID, smatra se da je indometacin jači vazokonstriktor koji trajnije djeluje na smanjenje cerebralnog protoka krvi i inhibira reaktivnost CO<sub>2</sub> [10]. Postoje istraživanja koja pokazuju direktnu inhibiciju neuronske aktivnosti kod trigeminocervikalnog kompleksa do određene mjere [10].

### 2.2.2. Mehanizam djelovanja

Indometacin je nespecifični reverzibilni inhibitor enzima ciklooksigenaze ili prostaglandin G/H sintaze. Indometacin se veže na aktivno mjesto enzima i tako sprječava interakciju između enzima i molekule arahidonske kiseline. Analgetska, antipiretska i potuupalna svojstva, kao i nuspojave korištenja indometacina dovode do smanjenja sinteze prostaglandina (PG) [8]. U organizmu postoje dva izozima ciklooksigenaze: COX-1, koji je prisutan u gotovo svim tkivima u tijelu i uključen je u sintezu prostaglandina i tromboksana A<sub>2</sub>; COX-2, je izozim koji se izlučuje kao odgovor na ozljedu ili upalu. Izozim COX-1 ima ulogu zaštite probavne sluznice i funkcije bubrega na način da katalizira pretvorbu molekule

arahidonske kiseline u prostaglandin G2 (PGG2), te PGG2 do PGH2. Izozim COX-2 se izlučuje u slučaju prisutnosti molekula koje stimuliraju upalu. COX-2 prisutan je u CNS-u, bubrezima, maternici i ostalim organima. COX-2 također katalizira pretvorbu molekule arahidonske kiseline do PGG2 te PGG2 do PGH2. U slučaju djelovanja COX-2, PGH2 se prevodi dalje u molekule PGE2 i PGI2 (prostaciklin). PGE2 molekula uključena je u posredovanje boli, upale i temperature pa sniženjem njezine koncentracije dolazi do smanjenja upalnih reakcija. Indometacin djeluje kao inhibitor za oba izozima ciklooksigenaze, ali ima jače djelovanje na COX-1 izozim. Štetne nuspojave korištenja indometacina koje se odnose na gastrointestinalni sustav dokaz su da indometacin ima jače djelovanje na COX-1 izozim [8].

### **2.2.3. Farmakokinetika indometacina**

Indometacin pokazuje tzv. linearnu farmakokinetiku. Kod linearne farmakokinetike koncentracija tvari u plazmi je proporcionalna dozi. Molekula indometacina se lako i brzo apsorbira u gastrointestinalnom traktu. Bioraspoloživost nakon oralne primjene je gotovo 100%, a unutar četiri sata apsorbirano je oko 90% primijenjene doze. Volumen distribucije proteže se od 0,34 do 1,57 L/kg. Iako je ustanovljeno da indometacin prolazi kroz krvno-moždanu ovojnicu, tek mali dio molekula prolazi u slobodnom, nevezanom obliku [10].

Indometacin se metabolizira u jetrima, konjugacijom sa glukuronskom kiselinom; O-dezmetilacijom i N-deacilacijom. N-dezklorobenzoil-indometacin i O-dezmetil-N-dezklorobenzoil-indometacin metaboliti i njihovi glukuronidi su neaktivni oblici te nemaju nikakvo protuupalno djelovanje [10]. Eliminacija indometacina odvija se urinom, žuči i fecesom. Otprilike 33% doze indometacina izlučuje se u demetiliranom, nekonjugiranom obliku pomoću fecesa; 1,5% se izlučuje u obliku indometacina. Oko 60% primijenjene doze izlučuje se urinom kao metaboliti indometacina ili kao nepromijenjena molekula [10].

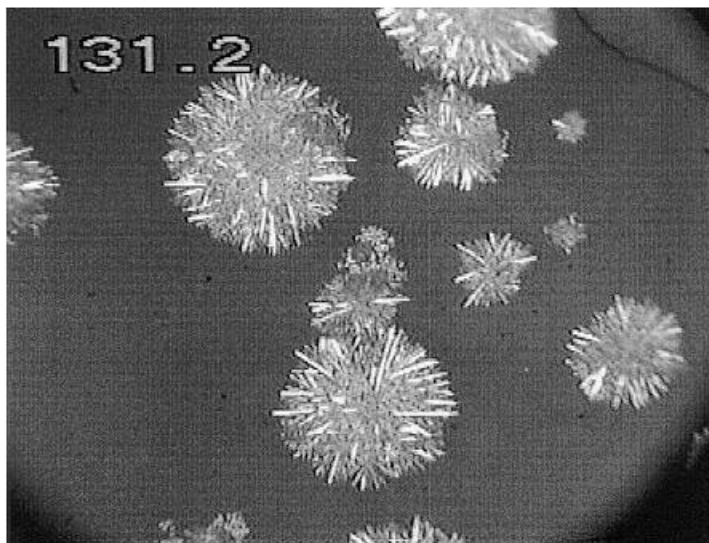
### **2.2.4. Nuspojave korištenja indometacina**

Većina mogućih nuspojava korištenja indometacina povezana je sa primijenjenim dozama. Moguće su razne vrste nuspojava koje imaju djelovanje na kardiovaskularni, gastrointestinalni, živčani sustav, hematološki problemi, itd. Najčešća nuspojava korištenja indometacina, povezana sa predoziranjem je glavobolja koja se pojavila kod minimalno 10% pacijenata. Nešto rjeđe nuspojave su mučnina i dispepsija, a pojavljivale su se kod 3-9% pacijenata. Dijareja, bol u abdomenu i konstipacija pojavljivale se kod 1-3% pacijenata [10].

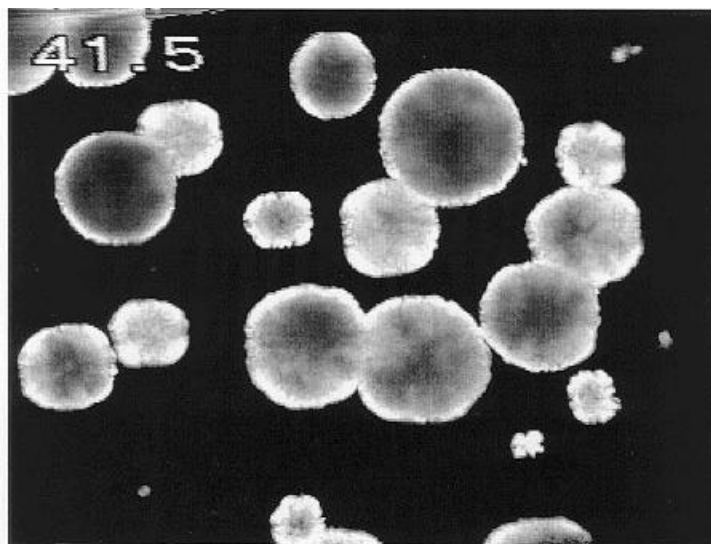
Ostale moguće nuspojave su povraćanje, dezorijentiranost, slabost, parestezija i konvulzije. Štetnost indometacina izražena je u obliku letalnih doza za miševe i štakore. Akutna letalna doza, LD50 indometacina izmjerena kod štakora iznosi 2,42 mg/kg; kod miševa 13 mg/kg [8].

#### 2.2.5. Farmaceutsko-tehnološki aspekti

Indometacin je na tržištu dostupan u više ljekovitih oblika koje proizvode razne farmaceutske tvrtke. Dostupni ljekoviti oblici indometacina su: kapsule (oralno); kapsule sa odgođenim/produženim djelovanjem (oralno), otopina kapi (za oftalmološku primjenu); oralna suspenzija (oralno); liofilizirani prašak za injekcijsku otopinu (intravenozno); supozitoriji (rektalno); kožni sprej (vanjski, lokalno); krema (vanjski, lokalno). Na tržište dolazi pod različitim marketinškim imenima: „Indocin“, „Indolar“, „Indocid“, „Indoxen“, „Elmetacin“, „Indoflex“, „Metindol“, itd. [8]. Indometacin se kao kemikalija u industrijskoj primjeni nalazi u obliku blijedo žutog kristalnog praha [15]. Kod indometacina prisutan je polimorfizam, tj. postojanje tvari u više kristalnih oblika. Prema nekim istraživanjima indometacin postoji u nekoliko oblika, ali sva istraživanja slažu se oko postojanja dva oblika (Form I i Form II; odnosno  $\gamma$ -oblik i  $\alpha$ -oblik). Za navedene oblike postoje podaci o točkama tališta, IR analize i rentgenske difrakcije praha. Od navedenih oblika,  $\gamma$ -oblik je termodinamički stabilniji što se može zaključiti zbog činjenice da ima višu točku tališta i slabiju topljivost [18].



Slika 5. Fotomikrografski prikaz kristala  $\gamma$ -oblika koji rastu iz amorfne faze [24].

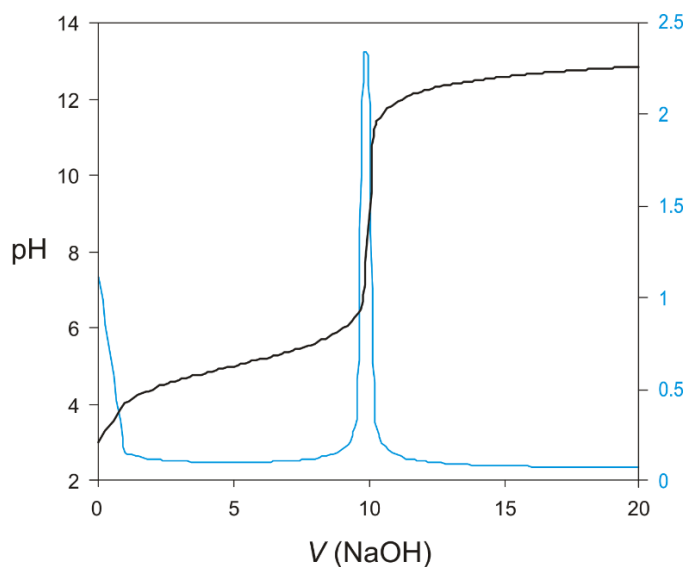


Slika 6. Fotomikrografski prikaz kristala  $\alpha$ -oblika koji rastu iz amorfne faze [24].

Topljivost indometacina u vodi je vrlo mala, a iznosi 0,937 mg/L pri temperaturi od 25 °C [8]. Prema USP (United States Pharmacopoeia) indometacin spada u „praktički netopljive spojeve“ (u vodi). Za poboljšanje kinetike topljivosti razvijeno je mnogo farmaceutsko tehnoloških strategija. Mogu se pripremljati krute disperzije lijeka [19], emulzije [20], mikrokapsule [21], ili soli [22]. Priprava nanokristala je jedan od ustaljenih principa za poboljšanje brzine topljivosti, ali nanokristali nisu dovoljno stabilni. Postoji više metoda pripreme nanokristala, kao što su: otparavanje otapala u nano-spray sušilu, vlažno mljevenje i liofilizacija, cryo-mljevenje u prisutnosti tekućeg dušika, itd. [23]. Kod suspenzija nanokristala često dolazi do aglomeracije nanokristala u veće čestice. Kako bi se spriječila aglomeracija potrebno je na neki način stabilizirati nanokristale. Stabilizacija se postiže nekom od vrsta površinske modifikacije nanokristala. Za površinsku modifikaciju potrebno je znati koloidna svojstva suspenzije nanokristala, kao što su distribucija veličine, oblik i morfologija kristala te površinska svojstva, kao što je količina slobodnih površinskih disocirajućih skupina i zeta potencijal. Zeta potencijali se rutinski određuju mjerenjem elektroforetičke mobilnosti, dok za određivanje disocijabilnih površinskih protona na nanokristalima lijekova ne postoji standardizirana metoda. Određivanje površinskih disocirajućih skupina na mineralnim nanočesticama često se izvršava pomoću potenciometrijske titracije [16]. Koristeći analogiju te karakterizacije pokušat će se odrediti disocijabilni protoni na površini nanokristala indometacina.

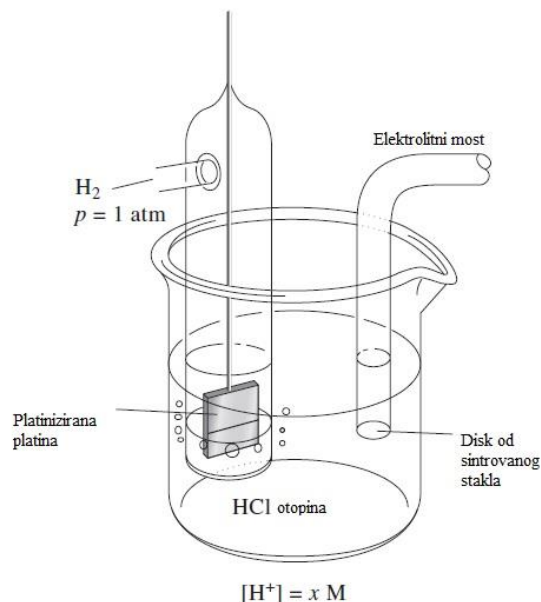
### 2.3. Potenciometrijska titracija

Potenciometrijska titracija je volumetrijska metoda kojom se mjeri potencijal između dvije elektrode, a zatim se taj potencijal prikazuje kao funkcija volumena reagensa dodanog u otopinu. Vrste elektroda čiji se potencijal mjeri su referentna i indikatorska elektroda. Temeljni princip potenciometrijske titracije je određivanje nepoznate koncentracije ispitivane otopine titracijom s nekom standardnom otopinom pri čemu nagla promjena potencijala indikatorske elektrode određuje završnu točku titracije [11].



Slika 7. Grafički prikaz potenciometrijske titracije [11].

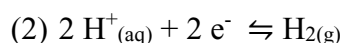
Titracijska krivulja kod potenciometrijske titracije ima karakterističan sigmoidni oblik. Ekvivalentna točka titracije je dio krivulje s maksimalnom promjenom potencijala. Točka ekvivalencije određuje se iz diferencijalne krivulje  $\Delta E/\Delta V$  gdje maksimum krivulje određuje točku ekvivalencije [11]. Referentna elektroda je polučlanak sa poznatim elektrodnim potencijalom,  $E_{ref}$ , koji ne ovisi o koncentraciji analita ni o koncentracijama drugih iona prisutnih u ispitivanoj otopini [12]. Idealna referentna elektroda ima potencijal koji je poznat, stalan i potpuno neovisan o sastavu otopine analita. Također, referentna elektroda mora biti jednostavne izvedbe, a pri prolazu malih struja mora zadržavati konstantan potencijal [12]. Univerzalna referentna elektroda je standardna vodikova elektroda (SVE). Prema njoj se određuju potencijali drugih elektroda.



Slika 8. Standardna vodikova elektroda [13].

Na slici (Slika 8.) je prikazana standardna vodikova elektroda. Metalni vodič je pločica platine presvučena (platinizirana) fino usitnjenom crnom platinom kako bi se postigla velika površina. Ta je elektroda uronjena u vodenu otopinu kiseline poznatog aktiviteta vodikovih iona. Otopina se održava zasićenom vodikom tako da se plin pod stalnim tlakom propušta na površinu elektrode. Platina ne sudjeluje u elektrokemijskoj reakciji i služi samo kao mjesto na koje se prenose elektroni [12].

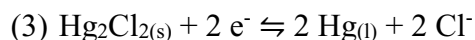
Elektrodna reakcija polučlanka ove elektrode je:



Zbog poteškoća sa održavanjem standardne vodikove elektrode, ona se zamjenjuje sa sekundarnim elektrodama čiji su potencijali također poznati. Neke od elektroda koje se koriste umjesto SVE su kalomelova elektroda (postoje tri vrste: 0,1M; 3,5M; zasićena) i elektroda srebro/srebrov klorid (postoje dvije vrste: 3,5M; zasićena).

Kalomelova elektroda prikazuje se na sljedeći način:  $\text{Hg} \mid \text{Hg}_2\text{Cl}_{2(\text{zas.})}, \text{KCl} (x \text{ M}) \mid$

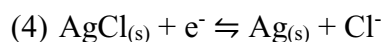
Elektrodna reakcija polučlanka kalomelove elektrode:





Elektroda srebro/srebrov klorid prikazuje se na sljedeći način:  $\text{Ag} \mid \text{AgCl}_{(\text{zas.})}, \text{KCl}_{(\text{zas.})} \mid$

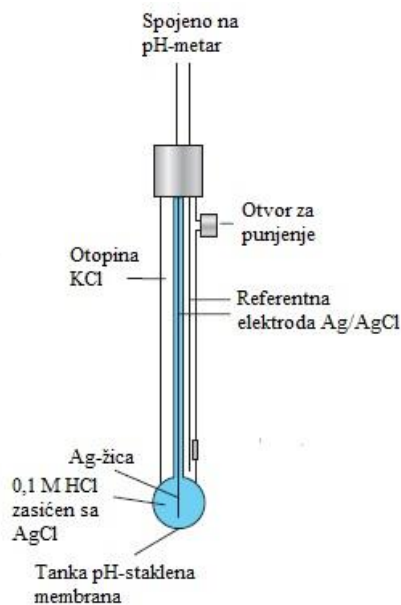
Elektrodna reakcija polučlanka elektrode Ag/AgCl:



Tablica 3. Elektrodni potencijali referentnih elektroda kao funkcije sastava i temperature [12].

Temperatura °C	Potencijal (prema SVE), V				
	0,1M Kalomel	3,5M Kalomel	Zasićena Kalomel	3,5M Ag/AgCl	Zasićena Ah/AgCl
12	0,3362	/	0,2528	/	/
15	0,3362	0,254	0,2511	0,212	0,209
20	0,3359	0,252	0,2479	0,208	0,04
25	0,3356	0,250	0,2444	0,205	0,199
30	0,3351	0,248	0,2411	0,201	0,194
35	0,3344	0,246	0,2376	0,197	0,189

Indikatorska elektroda daje brz i reproducibilan odziv na promjene koncentracije iona analita. Ne postoji potpuno selektivna indikatorska elektroda. Indikatorske elektrode dijelimo na dvije vrste: metalne i membranske [12]. Indikatorska elektroda korištena u ovom radu je staklena pH-elektroda. Ona se sastoji od tanke staklene membrane osjetljive na pH, smještene na jednom kraju staklene ili plastične cijevi debele stijenke. U cijevi se nalazi mala količina razrijeđene klorovodične kiseline, zasićene srebrovim kloridom (kod nekih elektroda unutrašnja otopina je pufer koji sadrži kloridne ione). Srebrna žica u toj otopini predstavlja referentnu elektrodu Ag/AgCl, koja je spojena na jedan od priključaka instrumenta za mjerenje potencijala. Na drugi priključak spojena je referentna elektroda. Iako je unutrašnja referentna elektroda dio staklene elektrode ona nije osjetljiva na pH. Odaziv na pH pokazuje tanka staklena membrana na vrhu elektrode [13]. Koncentracija (i aktivitet) protona unutar membrane staklene elektrode je konstantna. Koncentracija izvan membrane određuje se pomoću aktiviteta vodikovih iona u otopini analita. Razlika u koncentraciji stvara razliku u potencijalu koja se može izmjeriti pomoću instrumenta za mjerenje pH [13].



Slika 9. Shematski prikaz staklene pH-elektrode [13].

### 2.3.1. Mjerenje površinskog naboja potenciometrijskom titracijom

Postoji nekoliko metoda pomoću kojih je moguće izmjeriti površinski naboj, površinski potencijal ili zeta-potencijal. Glavna metoda za određivanje gustoće površinskog naboja ( $\sigma_0$ ) supstrata je potenciometrijska titracija suspenzije. Titracija čestica raspršenih u vodenoj otopini može se izvesti na nekoliko načina, ovisno o cilju istraživanja: potenciometrijska kiselo-bazna titracija (volumetrijska ili kulometrijska), potenciometrijska masena titracija i potenciometrijska elektrolitna titracija. Ovaj rad fokusiran je na potenciometrijsku kiselo-baznu titraciju u kojoj se mjeri ovisnost pH vrijednosti suspenzije o dodanom volumenu titranta (titrant može biti jaka kiselina ili jaka baza). Rezultat ove vrste potenciometrijske titracije prikazuje se u obliku naboja povezanog sa adsorpcijskim i desorpcijskim reakcijama protona i hidroksidnih iona. Ako je početni sadržaj, tj. koncentracija kiseline ili baze poznata, a uzorak ne sadrži nečistoće (u obliku kiseline ili baze), te ima dovoljno visok udio krute tvari, pomoću potenciometrijske titracije može se izmjeriti naboj. U slučaju bilo kakve devijacije od idealnih uvjeta rezultate se gleda kao relativne vrijednosti. Relativne vrijednosti mogu se preračunati u apsolutne ako postoji podatak o vrijednosti PZC (Point of Zero Charge - pH pri kojem je naboj jednak nuli) uz „ignoriranje“ devijacija izazvanih ranije spomenutim onečišćenjima. Važno je naglasiti da se ovom metodom pri mjerenju pH ne može rasčlaniti razlika otpuštanja  $H^+$  iona od vezanja  $OH^-$  iona i obrnuto

[14]. Za početak je potrebno matematički definirati Gibbsovu slobodnu energiju formacije površinskog naboja:

$$(5) \Delta G^\emptyset = \Delta G_{chem}^\emptyset + \Delta G_{el}^\emptyset$$

Gibbsova slobodna energija formacije površinskog naboja sastoji se od kemijskog dijela ( $\Delta G_{chem}^\emptyset$ ) i elektrostatskog dijela ( $\Delta G_{el}^\emptyset$ ). Kemijski dio određen je površinskim kemijskim reakcijama protonacije i deprotonacije. Elektrostatski dio određen je razvijanjem elektrostatskog potencijala na površini u procesu protonacije i deprotonacije [16]. Ukupna slobodna energija izražava se pomoću konstante vidljive ionizacije (apparent ionization constant)  $K_{app}$ :

$$(6) \Delta G^\emptyset = RT \ln K_{app}$$

Ranije spomenuti kemijski dio izražava se pomoću intrinzične konstante ionizacije (intrinsic ionization constant)  $K_{int}$ :

$$(7) \Delta G_{chem}^\emptyset = RT \ln K_{int}$$

Elektrostatski dio izražava se pomoću razlike potencijala ( $\Psi_0$ ):

$$(8) \Delta G_{el}^\emptyset = \Delta z F \Psi_0$$

**R** – opća plinska konstanta; **T** – apsolutna temperatura;  **$\Delta z$**  – promjena naboja površinske skupine (+1 ili – 1 u slučaju protonacije/deprotonacije); **F** – Faradayeva konstanta;  **$\Psi_0$** – razlika potencijala.

Kombinacijom izraza za konstante  $K_{int}$  i  $K_{app}$  sa jednažbom pod (5) dobiva se Nernstova jednažba ovisnosti razlike potencijala ( $\Psi_0$ ) o aktivitetu  $H^+$  ( $\ln a_{H^+}$ ) iona za trenutno stanje u usporedbi sa stanjem pri kojem je naboj jednak nuli, tj. točka PZC [16]:

$$(9) \Psi_0 = \left( \frac{RT}{\Delta z F} \right) (\ln a_{H^+} - \ln a_{H^+,PZC})$$

Općenito primjenjeni oblik Nernstove jednadžbe koristi pH vrijednosti umjesto aktiviteta  $H^+$  iona:

$$(10) E = -2,303 \left( \frac{RT}{\Delta z F} \right) (pH - pH_{ref})$$

U slučaju pH elektrode jednadžba glasi:

$$(11) \Psi_0 = -2,303 \left( \frac{RT}{\Delta z F} \right) (pH - pH_{PZC})$$

Za određivanje gustoće površinskog naboja potreban je podatak o površinskom suvišku protona.

Za titraciju kisele suspenzije jakom bazom vrijedi slijedeća relacija :

$$(12) \Gamma_{H^+} - \Gamma_{OH^-} = \frac{c_{NaOH}(v_b - v_d)}{s\gamma V}$$

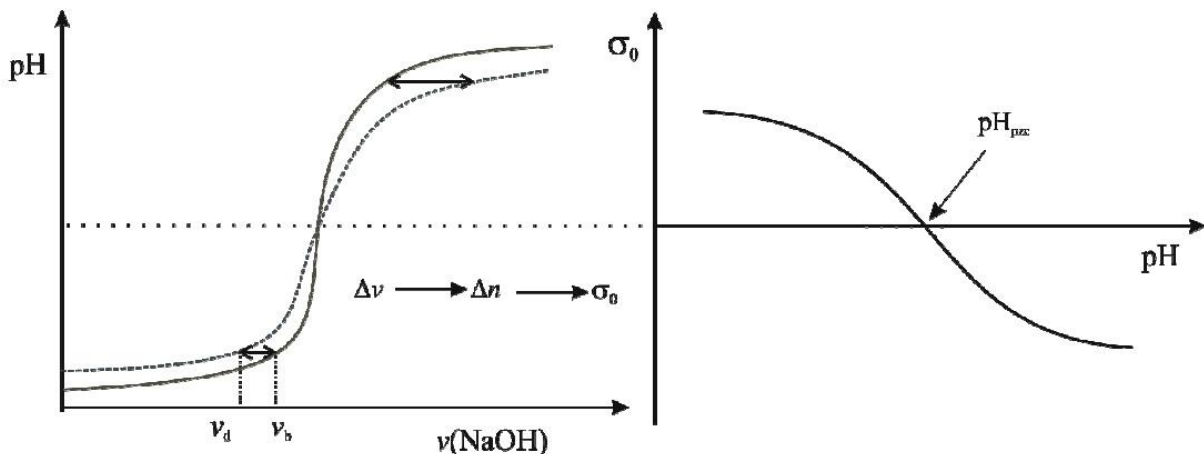
U obrnutom slučaju titracije bazične suspenzije jakom kiselinom vrijedi slijedeća relacija:

$$(13) \Gamma_{H^+} - \Gamma_{OH^-} = - \frac{c_{HCl}(v_b - v_d)}{s\gamma V}$$

Gdje je:  $\Gamma$  ( $\Gamma_{H^+}$  i  $\Gamma_{OH^-}$ ) – površinska koncentracija određene vrste, tj.  $H^+$  ili  $OH^-$  (količina mola podijeljena sa relevantnom površinom povezana sa promjenom koncentracije iste tvari u otopini);  $c_{NaOH}$  i  $c_{HCl}$  – koncentracije titranta (jaka baza i jaka kiselina);  $v_b$  – volumen titranta dodan u titraciju slijepe probe;  $v_d$  – volumen titranta dodan pri titraciji disperzije kako bi se postigao isti pH kao kod  $v_b$ ;  $s$  – specifična površina krutine (površina podijeljena s masom krutih čestica);  $\gamma$  – masena koncentracija krutine;  $F$  – Faradayeva konstanta;  $\sigma_0$  – gustoća površinskog naboja. Vrijednosti  $\Gamma_{H^+}$  i  $\Gamma_{OH^-}$  su pozitivne u slučaju vezanja na površinu i negativne u slučaju otpuštanja s površine. Interakcije  $H^+$  i  $OH^-$  iona sprječavaju mogućnost određivanja zasebnih ranije navedenih vrijednosti, ali njihova razlika ( $\Gamma_{H^+} - \Gamma_{OH^-}$ ) prikazuje se kao ukupni utrošak  $H^+$  ili otpuštanje  $OH^-$  iona [14]. Gustoću površinskog naboja tvari koji je nastao procesom prijenosa protona moguće je definirati pomoću podataka ukupnog površinskog suviška protona iz jednadžbi (12) ili (13):

$$(14) \sigma_0 = F(\Gamma_{H^+} - \Gamma_{OH^-})$$

$\sigma_0$  – gustoća površinskog naboja;  $F$  – Faradayeva konstanta; ( $\Gamma_{H^+} - \Gamma_{OH^-}$ ) – površinski suvišak protona.



Slika 10. Shematski prikaz potencijometrijske titracije (lijevo): titracija slijepe probe (puna linija), titracija koloidne suspenzije (isprekidana linija); Shematski prikaz površinskog naboja kao funkcije pH (desno) [14].

### 3. Eksperimentalni dio:

#### 3.1. Priprava nanosuspenzije indometacina

Nanosuspenzija indometacina pripremljena je homegenizacijom na visokom pritisku (High Pressure Homogenization - HPH) pomoću HPH instrumenta APV 2000. U tu svrhu pripremljena je 2% vodena suspenzija indometacina čija je prosječna veličina kristala iznosila 300 mikrometara. Suspenzija je podvrgnuta homogenizaciji pri tlaku,  $p=300$  bar i 5 prolazaka kroz HPH.

#### 3.2. Karakterizacija nanosuspenzije

##### 3.2.1. Određivanje Zeta-potencijala mjerenjem elektroforetičke mobilnosti

Instrument: Malvern Zetasizer Nano Z

Princip: Zetasizer Nano Z koristi tehnologiju mikro-elektroforeze/elektroforetičko rasipanje svjetlosti za mjerenje zeta potencijala i elektroforetičke mobilnosti. Laserska Doppler mikroeletroforeza koristi se za mjerenje zeta potencijala. Otopina molekula ili disperzija čestica stavlja se u električno polje u kojem se čestice analizirane tvari kreću brzinom koja odgovara njihovom zeta potencijalu. Brzina se mjeri patentiranom laserskom interferometrijskom tehnikom M3-PALS (Phase analysis Light Scattering). Navedena metoda omogućuje izračunavanje elektroforetičke mobilnosti iz koje se zatim može izračunati zeta potencijal i distribucija zeta potencijala [25].

### **3.2.2. Dinamičko raspršivanje svjetlosti (Dynamic Light Scattering, DLS) za određivanje raspodjele veličine kristala indometacina**

Instrument: Malvern Zetasizer Nano S

Princip: Navedeni instrument kombinira dvije tehnike pomoću kojih se dobiva veliki spektar mogućnosti i alata za optimiziranje i jednostavnije mjerenje različitih vrsta uzoraka. DLS se koristi za mjerenje veličine čestica i molekula. Ova tehnika mjeri difuziju čestica koje su u Brownovom gibanju i te podatke pretvara u veličinu i distribuciju veličine koristeći Sokes-Einsteinovu jednadžbu. NIBS (Non-Invasive Back Scatter technology) inkorporirana je kako bi dala najveću osjetljivost preko najvećeg područja veličine i koncentracije [26].

### **3.2.3. Transmisijska elektronska mikroskopija (Transmission Electron Microscopy - TEM)**

Instrument: JEOL TEM

Princip: Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) koristi visokoenergetske elektrone koje šalje kroz vrlo tanak sloj uzorka. Interakcije do kojih dolazi između elektrona i atoma uzorka mogu se koristiti za karakteriziranje svojstava kao što su kristalna struktura i svojstava strukture kao dislokacije i granice zrnaca čestica. Pomoću TEM-a može se provoditi i kemijska analiza uzorka. Ovom tehnikom može se pratiti razvijanje slojeva, njihov sastav i defekti u sastavu uzorka. TEM radi na istom principu kao svjetlosni mikroskop ali koristi elektrone umjesto svjetla. Pošto je valna duljina elektrona puno manja od valne duljine svjetlosti, optimalna rezolucija koju je moguće postići za TEM-slike je nekoliko redova veličine kvalitetnija od rezolucije koja se može dobiti svjetlosnim mikroskopom. Iz tog razloga TEM omogućuje uvid u najsitnije detalje unutarnje strukture promatranog uzorka, a u nekim slučajevima se radi o individualnim atomima [27].

### **3.2.4. Potenciometrijska karakterizacija nanosuspenzije**

U eksperimentu je korišten kruti indometacin za izradu nanosuspenzije na kojoj se vršila analiza, a o izradi navedene nanosuspenzije se detaljnije može pročitati pod 3.2. Kruti NaOH korišten je za izradu otopine koncentracije,  $c_{\text{NaOH}}=1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$  i  $c_{\text{NaOH}}=4 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ . Otopine NaOH standardizirane su otopinom HCl. Za izradu otopina, kao otapalo se koristila pročišćena, deionizirana voda. Postupak se odvijao pomoću instrumenta za automatsku titraciju

Metrohm 808 Titrando i magnetske mješalice Metrohm 801 Magnetic Stirrer koja je održavala razinu raspršenosti kristala u suspenziji tijekom postupka titracije.



Slika 11. Metrohm 808 Titrando i Metrohm 801 Magnetic Stirrer [17].

Referentne elektrode Ag/AgCl (Methrom), te indikatorske, staklene-Ph elektrode. Standardni laboratorijski pribor (epruvete, čaše, tikvice, kapaljke, stalci, itd.) nije nabrojen. Nanosuspenzija indometacina stavljena je na magnetsku mješalicu te su elektrode i cijevi titratora uronjene u čašu. Nanosuspenzija indometacina titrirana je otopinom NaOH. Postupak je kontroliran i praćen pomoću softwera za titraciju (Tiamo). Rezultati analize obrađeni su i grafički prikazani softwareom Microsoft Excel, a u ovom radu biti će prikazani u poglavlju 4.



Slika 12. Aparatura za izvođenje eksperimentalnog dijela rada

## 4. Rezultati i rasprava

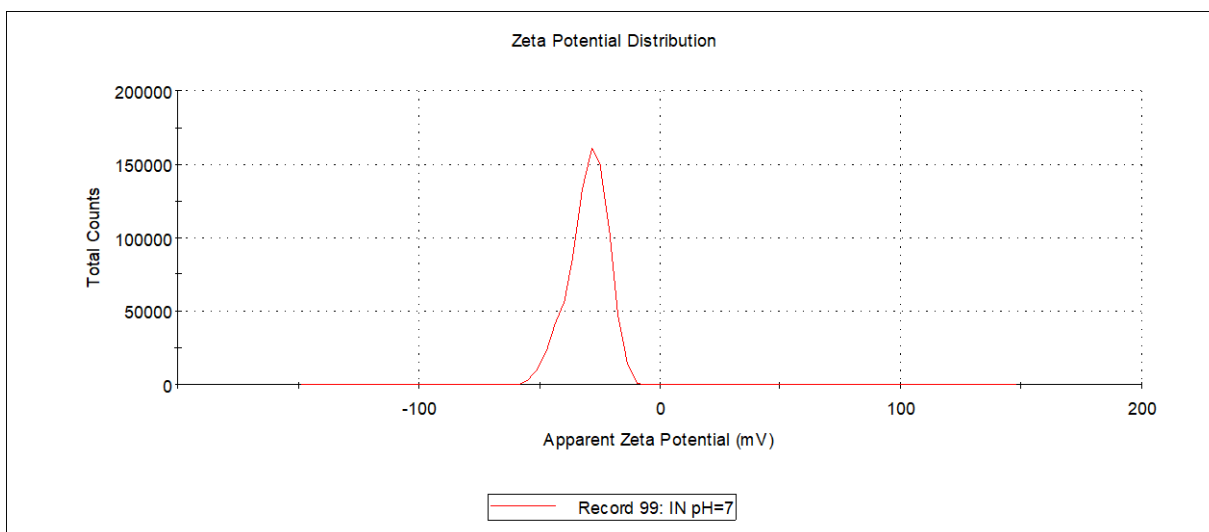
### 4.1. Priprava nanosuspenzije indometacina

Nakon homogenizacije na visokom pritisku pripravljena je homogena suspenzija indometacina, bijele boje, koja nije sedimentirala ni nakon 30 dana pohranjivanja na 4 °C.

### 4.2. Karakterizacija nanosuspenzije

#### 4.2.1. Određivanje zeta potencijal mjerenjem elektroforetičke mobilnosti:

Izmjereni zeta potencijal suspenzije nanokristala indometacina iznosio je -29,7 mV. Vrijednost od -29,7 mV čini nanosuspenziju stabilnom. Na slici 13. i u tablici 4. rezultati mjerenja su prikazani grafički i numerički.



Slika 13. Grafički prikaz rezultata mjerenja zeta potencijala.

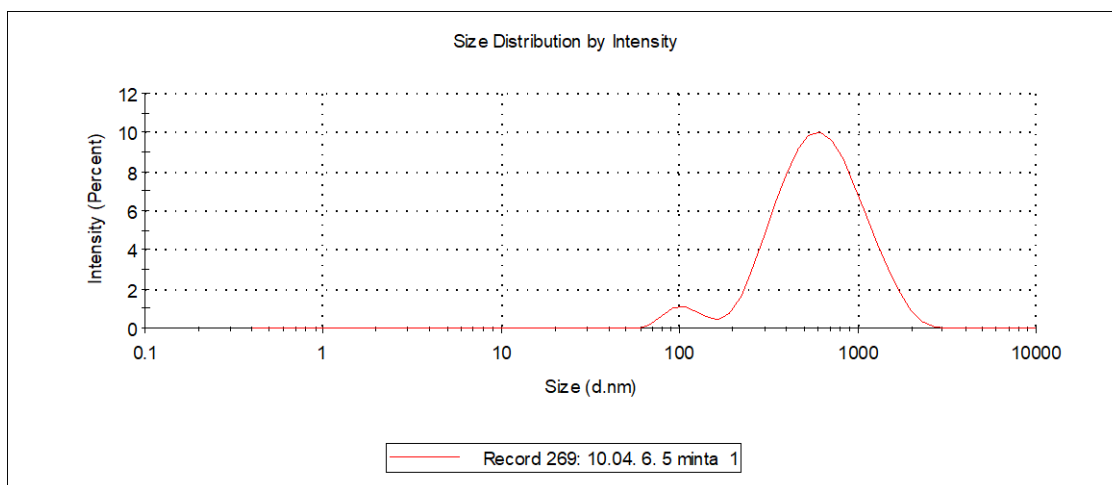
Tablica 4. Rezultati mjerenja zeta potencijala.

	pH	električna vodljivost [mS/cm]	Zeta Potencijal [mV]	[%] po intenzitetu	Std. Dev. (d, nm)
Indometacin 1 m/m %	7	0,00825	29,7	100	8,12



#### 4.2.2. Dinamičko raspršivanje svjetlosti (Dynamic Light Scattering DLS) za određivanje raspodjele veličine kristala indometacina

Određena je distribucija veličine kristala DLS metodom i rezultati prikazuju da postoje dva karakteristična vrha u distribuciji veličine kristala. Prvi vrh je zastupljen sa 4,7 % po intenzitetu raspršene svjetlosti, dok je drugi vrh 701 nm i 95,3%. Prosječna veličina kristala je bila 486 nm. Na slici 14. i u tablici 5. rezultati analize prikazani su grafički i numerički.



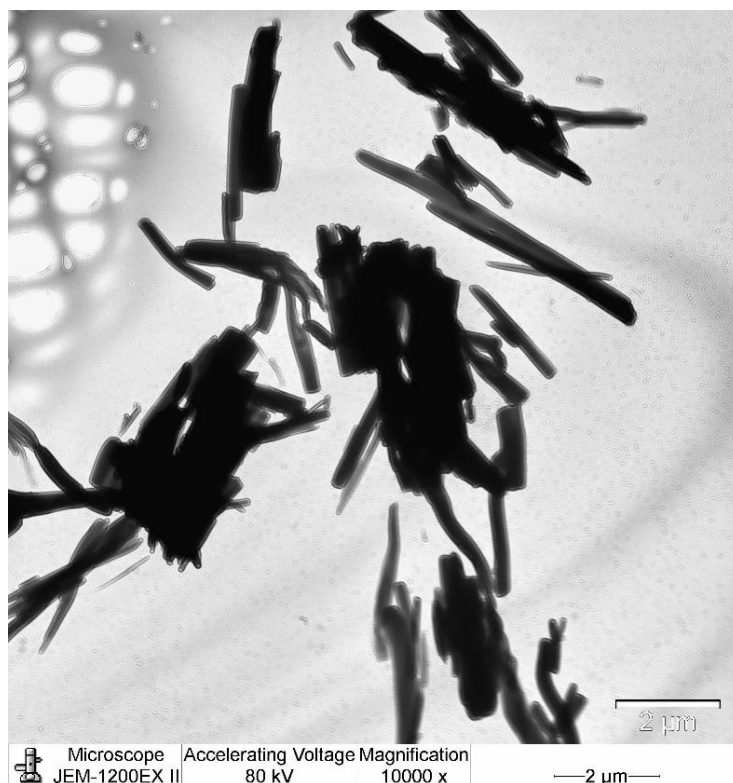
Slika 14. Grafički prikaz rezultata analize DLS metodom.

Tablica 5. Rezultati analize DLS metodom.

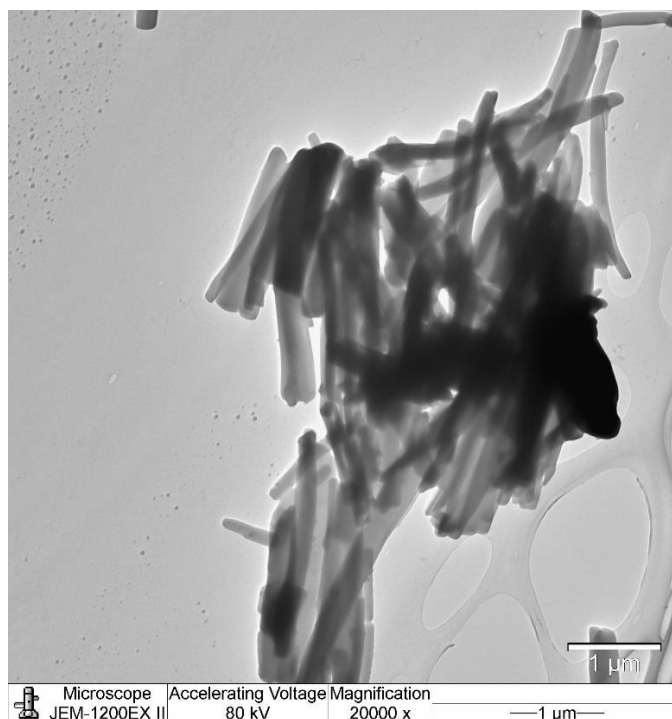
			<b>Veličina (d, nm)</b>	<b>% po intenzitetu</b>	<b>Std. Dev. (d, nm)</b>
<b>Prosječna veličina</b>	485	<b>Peak 1</b>	701	95,3	380
<b>PDI</b>	0,258	<b>Peak 2</b>	110	4,7	26

#### 4.2.3. TEM Transmisijnska elektronska mikroskopija (Transmission Electron Microscopy TEM)

Analizom kristala pomoću transmisijnske elektronske mikroskopije određen je izgled, dužina i širina kristala indometacina u nanosuspenziji. Kristali indometacina su igličasti. Dužina kristala iznosila je 1-3  $\mu\text{m}$ , a širina im je iznosila 100-300 nm. Slike 15. i 16. prikazuju TEM snimke kristala indometacina.



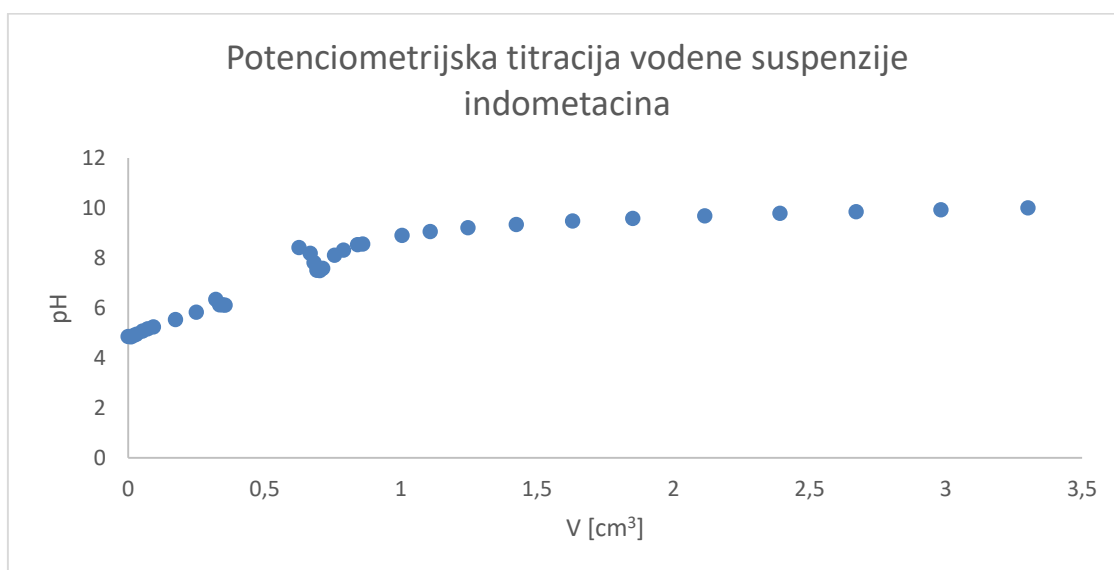
Slika 15. TEM snimka uzorka kristala indometacina.



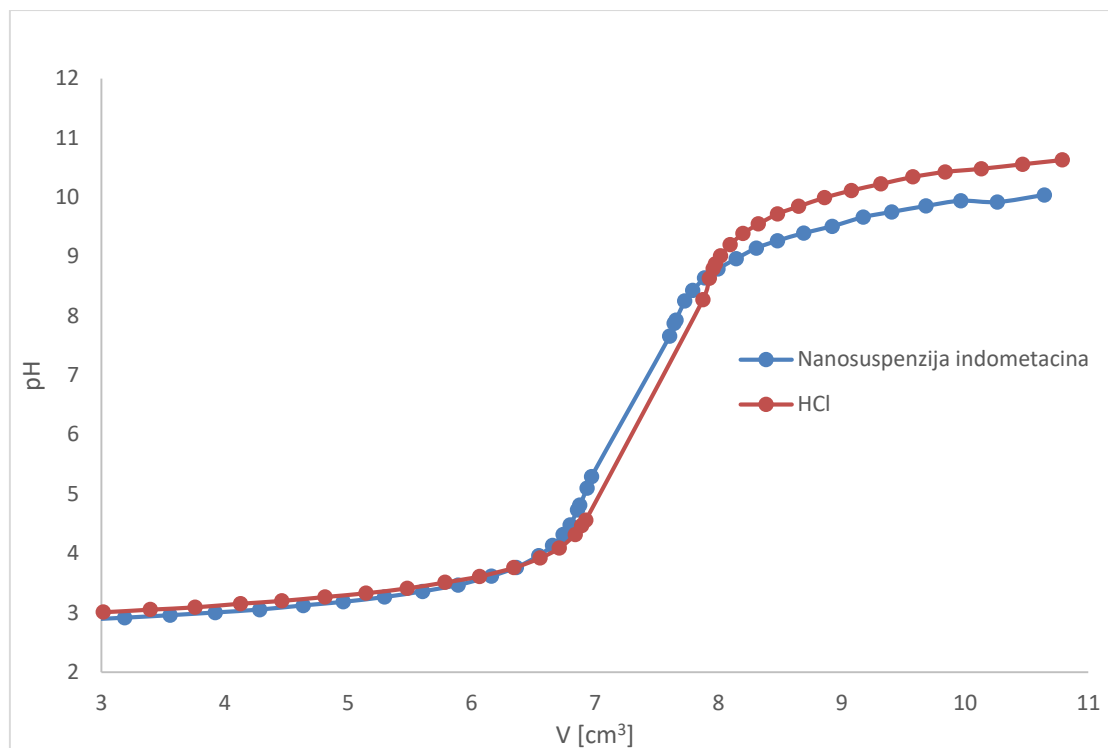
Slika 16. TEM snimka uzorka indometacina.

#### 4.2.4. Potenciometrijska karakterizacija nanosuspenzije

Rezultati titracije suspenzije indometacina koncentracije,  $c=0,13975 \text{ mol/dm}^3$ , prikazani su na slici 17.



Slika 17. Grafički prikaz potenciometrijske titracije vodene suspenzije indometacina otopinom NaOH,  $c_{\text{NaOH}}=1 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ .



Slika 18. Grafički prikaz potencijometrijske titracije otopine nanosuspenzije indometacina dispegrirane u HCl-u, pri čemu je i otopine HCl-a koncentracije,  $c_{\text{HCl}}=1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ , s otopinom NaOH koncentracije,  $c_{\text{NaOH}}=4 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ .

Nanočestice indometacina dispegrirane su u otopini HCl-a, a koncentracija iznosi  $c_{\text{Indometacin}}=0,13975 \text{ mol/dm}^3$ .

## 5. Zaključak

Uspješno je pripremljena suspenzija nanokristala indometacina korištenjem homogenizatora na principu visokog tlaka te je izvršena njena karakterizaciju. Distribucija veličine određena je pomoću dvije metode DLS i TEM. DLS metodom određena je prosječna veličina kristala od 486 nm, koja se ne podudara sa veličinama čestica koje se mogu odrediti sa TEM snimaka. Razlog se može naći u teoretskoj pozadini DLS mjerenja u kojoj se određivanje distribucije hidrodinamičkog promjera čestica vrši po Stokes-Einsteinovoj jednadžbi koja je definirana za monodisperzne sustave izometričnih čestica. Na TEM snimkama se vidi da su kristali indometacina igličasti, zbog čega se na njih ne može primijeniti Stokes-Einsteinova jednadžba. Pripravljena suspenzija indometacina ima igličaste kristale dužine od 1-3  $\mu\text{m}$  i promjera 100-300 nm. U vodenoj suspenziji čija je pH zbog disocijacije indometacina 4,5-5, nanokristali imaju negativan zeta potencijal (-29,7 mV), zbog kojeg je suspenzija indometacina stabilna. U svrhu određivanja površinskih disocijabilnih skupina na sučelju kristala i vode isprobana je potenciometrijska titracija. Prvi rezultati pokazali su očitu razliku između titracijskih krivulja, ali izračun površinskog suviška protona se nije mogao napraviti. Razlog tome je bila neodvoljna koncentracija krute tvari, i upitno stanje pH elektrode koja je korištena za potenciometrijska titriranja. Uz daljnu optimizaciju uvjeta titracije kao što su koncentracija krute tvari i koncentracija tiranta mogla bi se razviti metoda za brzu karakterizaciju nanosuspenzija lijekova.

## 6. Literatura

- [1] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4476996/> (26.07.2019)
- [2] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3399483/> (26.07.2019.)
- [3] R. Chang, J. Overby, General Chemistry: The Essential Concepts, Sixth Edition, McGraw-Hill, The McGraww-Hill Companies, Inc., 2011., New York (Str. 444.)
- [4] <https://glossary.periodni.com/glossary.php?en=permeability> (26.07.2019)
- [5] <https://www.fda.gov/media/117974/download> (26.07.2019.)
- [6] J. P. Griffin, The Textbook of Pharmaceutical Medicine, Sixth Edition, Wiley-Blackwell, A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, BMJ Books, 2009., UK
- [7] <https://en.wikipedia.org/wiki/Bioavailability> (26.07.2019.)
- [8] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00328> (13.08.2019)
- [9] <https://mediately.co/hr/drugs/ZQ0q3DDBAI8iQHGskD9UWdnoTdW/indometacin-belupo-25-mg-tvrde-kapsule#indications> (13.08.2019.)
- [10] S. Lucas, The Pharmacology of Indomethacin, Headache: The Journal of Head and Face Pain, Feb 56(2), 436-446., 2016.
- [11] <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=potenciometrijska+titracija> (21.08.2019.)
- [12] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, Osnove Analitičke Kemije, šesto izdanje (eng), prvo izdanje (hr), prevoditelji: N. Kujundžić, V. Živčić-Alegretti, A. Živković, Školska knjiga, Zagreb 1999.
- [13] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, Fundamentals of Analytical Chemistry, Ninth Edition, Brooks Cole Publishing, 2013.
- [14] J. Lüzenkirchen, T. Preočanin, D. Kovačević, V. Tomišić, L. Lövgren, N. Kallay, Potentiometric Titrations as a Tool for Surface Charge Determination, Croatica Chemica Acta 85 (4), 391-417., 2012.

- [15] <https://www.drugfuture.com/chemdata/Indomethacin.html> (30.08.2019)
- [16] M. Szekeres, E. Tombácz, Surface charge characterization of metal oxides by potentiometric acid-base titration, revisited theory and experiment, Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Vol. 414, str. 302-313., 20. Nov 2012.
- [17] <https://www.metrohm.com/en/products/28080020> (03.09.2019.)
- [18] American Pharmaceutical Association, Analytical Profiles of Drug Substances, Volume 13., M. O'Brien, J. McCauley, E. Choen, Indomethacin (Analytical profile), 1984.
- [19] M. El-Badry, G. Feith, M. Fathy, Improvement of solubility and dissolution rate of indomethacin by solid dispersions in Gelucire 50/13 and PEG400, Saudi Pharmaceutical Journal 2009., 17(3), 217-225. 2009.
- [20] S. Verma, K. Upadhaya, P. Dabral, V. Rana and Bhardwaj, Formulation of indomethacin emulsion using biopolymer of Prunus avium, Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 4(5), 23., 2012.
- [21] T.P. Shailesh, P.D. Vipul, J.K. Girishbhai, C.J. Manish, Preparation and in vitro Evaluation of Ethylcellulose Coated Egg Albumin Microspheres of Diltiazem Hydrochloride, Journal of Young Pharmacists, 2(1), 27-34., 2010.
- [22] M. Bookwala, P. Thipsay, S. Ross, F. Zhang, S. Bandari, M.A. Repka, Preparation of crystalline salt of indomethacin and tromethamine by hot melt extrusion technology, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 131, 109-119.
- [23] V. Martena, R. Censi, E. Hoti, L. Malaj, P. Di Martino, Indomethacin nanocrystals prepared by different laboratory scale methods: effect on crystalline form and dissolution behavior, Journal of Nanoparticle Research, 14(12), 2012.
- [24] V. Andronis, G. Zografi, Crystal nucleation and growth of indomethacin polymorphs from the amorphous state, Journal of Non-Crystalline Solids, 271(3), 236-248., 2000.
- [25] <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-z> (10.09.2019.)

[26] <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-s> (10.09.2019.)

[27]

<https://warwick.ac.uk/fac/sci/physics/current/postgraduate/regs/mpagswarwick/ex5/techniques/structural/tem/> (10.09.2019.)